

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年3月2日 (02.03.2006)

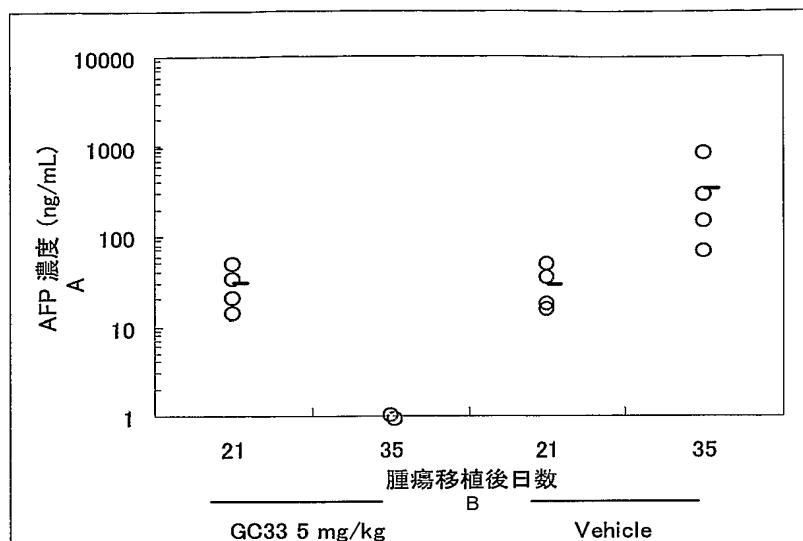
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/022407 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 39/395, A61P 35/00 (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/015607 (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2005年8月23日 (23.08.2005) (82) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-244273 2004年8月24日 (24.08.2004) JP
特願2005-090945 2005年3月28日 (28.03.2005) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 木下 恒子 (KINOSHITA, Yasuko) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 杉本正道 (SUGIMOTO, Masamichi) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 岡部 尚文 (OKABE, Hisafumi) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(54) Title: ADJUVANT THERAPY WITH THE USE OF ANTI-GLYCAN 3 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗グリピカン3抗体を用いたアジュvant療法



A AFP CONCENTRATION (ng/mL)

B TIME AFTER TUMOR TRANSPLANTATION (DAYS)

(57) Abstract: It is intended to provide an anticancer agent containing anti-glycan 3 antibody characterized by being administered after a treatment for cancer. The term "after a treatment for cancer" preferably means after a treatment for liver cancer, and "after a treatment for liver cancer" still preferably means after the removal of liver cancer cells. This anticancer agent is preferably employed in the case where glycan 3 is expressed in the removed liver cancer cells. It is also preferable that the anti-glycan 3 antibody is a monoclonal antibody. This anticancer agent is efficacious in preventing cancer or preventing cancer recurrence.

(57) 要約: 本発明は、癌治療後に投与されることを特徴とする、抗グリピカン3抗体を含有する抗癌剤を提供する。好ましくは、癌治療後は肝癌治療後であり、特に、肝癌治療は肝癌細胞切除である。好ましくは、本発明の抗癌剤は、切除された肝癌細胞にグリピカン3が発現している場合に使用される。また好ましくは、抗グリピカン3抗体はモノクローナル抗体である。本発明の抗癌剤は、癌の予防または再発予防に有用である。

WO 2006/022407 A1

抗癌剤は、切除された肝癌細胞にグリピカン3が発現している場合に使用される。また好ましくは、抗グリピカン3抗体はモノクローナル抗体である。本発明の抗癌剤は、癌の予防または再発予防に有用である。

明細書

抗グリピカン3抗体を用いたアジュバント療法

技術分野

5 本発明は、抗グリピカン3抗体を用いた癌治療後のアジュバント療法に関する。

背景技術

細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの新しいファミリーとしてグリピカンファミリーの存在が報告されている。現在までのところ、グリピカンファミリーのメンバーとして、5種類のグリピカン（グリピカン1、グリピカン2、グリピカン3、グリピカン4およびグリピカン5）が存在することが報告されている。このファミリーのメンバーは、均一なサイズ（約60kDa）のコアタンパク質を持ち、特異的でよく保持されたシステインの配列を共有しており、グリコシルフォスファチジルイノシトール（GPI）アンカーにより細胞膜に結合している。

中枢神経の発達における細胞分裂パターンが異常なショウジョウバエメラノガスター (*Drosophila melanogaster*) 変異体の遺伝子スクリーニングにより、Dally (division abnormally delayed) 遺伝子が同定された。Dally の cDNA は、グリピカンの全ての特徴を含んでいる脊椎動物の膜型プロテオグリカン (GRIPs) と相同配列 (24~26% 相同) を示す産物をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を表していることがわかっている。その後、dally が dpp (decapentaplegia) レセプター機構を調節する役割を持つことが示唆されており、このことから哺乳動物のグリピカンが TGF と BMP のシグナル伝達を調節している可能性を示唆している。すなわち、グリピカンがヘパリン結合性増殖因子 (EGF、PDGF、BMP2、FGF's 等) のいくつかの共同レセプターとして機能している可能性が示唆されていた。

グリピカン3は、ラットの小腸から発生的に調節されている転写物として分離され (Films, J., Church, J.G., and Buick, R.n. (1988) Mol. Cell Biol. 8, 4243-4249) 、後にグリピカンファミリーの、分子量 69kDa のコアタンパク質を

持った、GPI-結合型のヘパラン硫酸プロテオグリカン、OCI-5として同定された (Filmus, J., Shi, W., Wong, Z.-M., and Wong, M.J. (1995) Biochem. J. 311, 561-565)。ヒトにおいても、ヒト胃癌細胞株よりグリピカン3をコードする遺伝子が、MRX-7として単離されている (Hermann Lage et al., Gene 188 (1997) 151-156)。グリピカン3はインスリン様増殖因子-2とタンパク-タンパク複合体を形成し、この増殖因子の活動を調節することが報告されている (Pilia, G. et al, (1996) Nat. Genet. 12, 241-247)。この報告は、グリピカン3が必ずしもヘパラン硫酸鎖によって増殖因子と相互作用しているのではないことを示唆している。

また、グリピカン3について肝細胞癌マーカーとして利用できる可能性があることが報告されており (Hey-Chi Hsu et al., CANCER RESEARCH 57, 5179-5184(1997))、さらに抗グリピカン3抗体が肝癌細胞に対して細胞障害活性を有し、抗癌剤として有用であることが報告されている (国際公開公報WO 03/00883)。

しかしながら、抗グリピカン3抗体を癌治療後のアジュvant療法として用いることが可能であることは報告されていない。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、抗グリピカン3抗体が癌治療後のアジュvant療法に有用であることを見出し、本発明を完成させるに至った。また、抗グリピカン3抗体を癌治療後の癌細胞が観察されない段階で投与することにより、癌の再発防止が可能であることから、抗グリピカン3抗体は癌の予防剤または再発予防剤として有用である。

25 図面の簡単な説明

図1は、本発明の抗癌剤を肝内移植マウスマルクに投与したときの効果を示すグラフである。

図2は、本発明の抗癌剤を肝内移植マウスマルクに早期投与したときの効果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、癌治療後に投与されることを特徴とする、抗グリピカン3抗体を含有する抗癌剤を提供する。好ましくは、癌治療後は肝癌治療後であり、特に、肝癌治療は肝癌細胞切除である。好ましくは、本発明の抗癌剤は、切除された肝癌細胞にグリピカン3が発現している場合に使用される。また好ましくは、抗グリピカン3抗体はモノクローナル抗体である。

本発明の抗癌剤は、アジュバント療法において用いるのに特に有用である。癌の治療・手術において癌細胞が取り除かれた若しくは癌細胞を死滅させたと考えられる場合でも、観察されない癌細胞が残っていることがある。そのような癌細胞が残っている場合には、一定期間後に癌が再発することがあり、癌の治療後に癌の再発を予防するための治療を行う必要がある。そのような治療をアジュバント療法または術後補助療法という。

本発明において癌治療とは、癌の切除、抗癌剤を用いる化学療法、放射線療法、経皮的エタノール注入療法、経皮的ラジオ波照射熱凝固療法、経カテーテル肝動脈塞栓療法など、癌細胞の増殖抑制・癌細胞の死滅、癌細胞の減少などを目的とする限り、如何なる治療でもよい。本発明において好ましい癌治療は、癌の切除である。癌治療後とは、これらの治療が行われた後のこととをいう。なお、本発明においては、癌治療後とは、必ずしも癌が治癒されたことを意味しない。

本発明の抗グリピカン3抗体は、癌治療後の患者においてグリピカン3が発現しているか否かを確認した後に投与してもよい。グリピカン3が発現しているか否かの確認はどのような方法で行われてもよいが、例えば、抗グリピカン3抗体等を用いてグリピカン3タンパク質の発現を確認してもよいし、PCR法などによりグリピカン3遺伝子の発現を確認してもよい。

癌治療後に抗グリピカン3抗体を投与するタイミングとしては如何なるタイミングでもよく、癌治療の直後に投与してもよいし、期間をあけて投与してもよい。本発明において好ましい投与タイミングは癌治療後から癌再発までの間である。術後補助療法の場合、典型的には、治療後12週間以内や6週間以内に投与を開始する。癌が再発したか否かは当業者に公知の方法により判断することができ、

例えば、肉眼所見や病理所見により腫瘍が確認できるか否かで判断することができる。腫瘍の確認は AFP 等の腫瘍マーカーを指標とする方法やイメージングなど、当業者に公知の方法により行うことが可能である。

本発明の抗癌剤を用いて治療することができる癌は、肝癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、膵臓癌、胆管癌など、如何なる癌でもよい。

本発明の抗癌剤を用いて治療するのに特に適した癌は肝癌細胞である。肝癌は、原発性および続発性のどちらでもよく、例えば、肝細胞癌、肝内胆管癌、胆管囊胞腺癌、混合型肝癌、肝芽腫、未分化癌、血管肉腫、肝平滑筋肉腫、未分化肉腫などを挙げることができる。

本発明の抗癌剤を用いるアジュvant療法において特に好ましい態様は、肝癌細胞の切除後に抗グリビカン3抗体を投与することにより、肝癌の再発を予防することである。

本発明で使用される抗グリビカン3抗体は、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。

本発明で使用される抗グリビカン3抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗グリビカン3抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により産生されるものを含む。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、グリビカン3を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトグリビカン3を、Lage, H. et al., Gene 188 (1997), 151-156に開示されたグリビカン3 (MXR7) 遺伝子／アミノ酸配列にしたがって発現させることによって得る。グリビカン3の遺伝子配列

およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1およ2に示される。すなわち、グリピカン3をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトグリピカン3タンパク質を公知の方法で精製する。

5 次に、この精製グリピカン3タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、グリピカン3の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトグリピカン3のアミノ酸配列より化学合成により得ができる。

抗グリピカン3抗体は、ADCC・CDCなどの細胞障害活性により抗癌作用を示し、
10 また抗グリピカン3抗体に放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等の細胞傷害性物質を結合させることにより抗癌作用を示す。抗グリピカン3抗体の認識するグリピカン3分子上のエピトープは特定のものに限定されず、グリピカン3分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従つて、本発明の抗グリピカン3抗体を作製するための抗原は、グリピカン3分子上
15 に存在するエピトープを含む部分ペプチドであれば、如何なるものを用いてもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用されるべき親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげつ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。
20

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより免疫することができる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釀または懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

前記免疫細胞と融合されるの親細胞としては、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3

(P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1
Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1
(Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-
11 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M.
et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J.
Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med.
(1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-
133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たと
えは、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C.,
Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄
養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール
(PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高
めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例え
ば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1-10 倍とするのが好ましい。前記細胞
融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な
RPMI1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培
養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用するこ
ともできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく
混合し、予め 37°C 程度に加温した PEG 溶液 (例えば平均分子量 1000-6000 程
度) を通常 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする
融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、
遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより、ハイブリドーマの生育に好
ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば HAT 培
養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養す

ることにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよび单一クローニングを行う。

5 また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でグリピカン 3 に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、グリピカン 3 への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるグリピカン 3 を投与して抗グリピカン 3 抗体產生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からグリピカン 3 に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照）。

15 このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、
25 Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990 参照）。

具体的には、抗グリピカン 3 抗体を產生するハイブリドーマから、抗グリピカン 3 抗体の可変 (V) 領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry

(1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により行って全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用して目的の mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることにより mRNA を直接調製

5 することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-RACE 法

10 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択

15 して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

目的とする抗グリビカン 3 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み

20 込む。

本発明で使用される抗グリビカン 3 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

25 抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H鎖および L鎖をコードする DNA を单一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

また、組換え型抗体の產生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニッ

ク動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に產生されるタンパク質（ヤギ β カゼインなど）をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が产生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから產生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化(Humanized)抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照)。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する(WO98/13388号公報に記載の方法を参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域にお

けるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明で使用される抗体は、抗体の全体分子に限られずグリビカン3に結合し、グリビカン3の活性を阻害する限り、抗体の断片又はその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')²、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V

領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸 12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFv をコードする DNA は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする DNA、
5 および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする DNA のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて PCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードする DNA、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合せて増幅することにより得られる。

10 また、一旦 scFv をコードする DNA が作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って scFv を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗グリビカン抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

さらに、本発明で使用される抗体は、二重特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。二重特異性抗体はグリビカン 3 分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がグリビカン 3 を認識し、他方の抗原結合部位が化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞傷害性物質を認識してもよい。この場合、グリビカン 3 を発現している細胞に直接細胞傷害性物質を作用させ腫瘍細胞に特異的に傷害を与える、腫瘍細胞の増殖を抑えることが可能である。二重特異性抗体は 2 種類の抗体の HL 対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を

產生するハイブリドーマを融合させて二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー（*human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer*）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV40)等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α)などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法(Nature (1979) 277, 108)により、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法(Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法(Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法(Science (1988) 240, 1041-1043)により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pe1Bシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。そして、ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して(refold)使用する。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa 細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞を *in vitro* または *in vivo* で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができ、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

本発明で使用される抗体の抗原結合活性（Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）、リガンドレセプター結合阻害活性（Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690）の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用される抗グリビカン3抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、グリビカン3をコーティングしたプレートに、抗グリビカン3抗体を含む試料、例えば、抗グリビカン3抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。本発明に使用する抗体は、細胞傷害活性の測定は当業者に公知の方法により行うことができる。

ADCC 活性は、エフェクター細胞と標的細胞と抗グリピカン 3 抗体を混合し、ADCC の程度を調べることにより測定することができる。エフェクター細胞として例えば、マウス脾細胞や骨髓、ヒト末梢血から分離した単核球等を利用することができ、標的細胞としてはヒト肝細胞株 HuH-7 等のヒト株化細胞を用いることができる。
5 標的細胞をあらかじめ ^{51}Cr により標識し、これに抗グリピカン 3 抗体を加えインキュベーションを行い、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベーションを行う。インキュベーション後上清を採取し、上清中の放射活性をカウントすることにより ADCC 活性を測定することができる。

10 また、CDC 活性は、上述の標識標的細胞と抗グリピカン 3 抗体を混合し、その後補体を添加してインキュベーションを行い、培養後に上清中の放射活性をカウントすることにより測定することができる。

通常、抗体が細胞傷害活性を発揮するには、Fc 部分が必要であるので、本発明の細胞増殖阻害剤が、抗体の細胞傷害活性を利用したものである場合には、本
15 発明に使用する抗グリピカン 3 抗体は Fc 部分を含んでいることが好ましい。

本発明の抗癌剤は癌の予防または癌治療後の再発予防を目的として使用される。特に好ましくは、本発明の抗癌剤は、肝癌細胞の切除後に肝癌の再発予防を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり 0.001mg から 1000mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 0.01～100000mg/body の投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗グリピカン 3 抗体を含有する抗癌剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の抗癌剤は通常、非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

また、本発明の抗癌剤の投与時期としては、疾患の臨床症状が生ずる前後を問わず投与することができる。本発明の特に好ましい態様においては、本発明の抗癌剤は、肝癌細胞の切除後にアジュvant療法として投与することができる。

本発明の抗グリピカン 3 抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にした

がって製剤化することができ（Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗グリピカン3抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2004-244273および2005-90945号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1

肝内移植マウスモデルにおけるマウス抗ヒトグリビカン 3 抗体 GC33 の薬効試験

(1) α -フェトプロテイン(AFP)の測定

5 腫瘍マーカーとして、ヒト AFP 測定 ELISA キット (HOPE LABORATORIES 社製) を用い、血清中のヒト AFP 濃度を測定した。ELISA の測定限界は約 1 ng/mL であり、検出限界以下のサンプルについては 1 ng/mL とした。血清は眼窩採血により血液をセパラピット S (セキスイ化学) に採取し、室温で 15 分静置した後、
1200×g、20 分間遠心分離して得た。

10 (2) 肝内移植マウスモデルの作製

肝内移植マウスモデルは以下のように作製した。HepG2 細胞 (ATCC) をハンクス培地 (SIGMA 社製) で 1×10^8 個/mL になるように調製した。ネンブタールによる麻酔下で、ヌードマウス (チャールスリバー) の肝臓皮膜内へ HepG2 細胞懸濁液 50 μ L (5×10^6 個/マウス) を注入した。移植後 21 日に血清中の AFP 濃度を測定し、10 – 100 ng/mL の範囲の個体について 2 群に分けた (n=4)。この時点では肝癌細胞 (腫瘍塊) は肉眼では観察されず、肝切除後に残存する微小肝内転移のモデルとして用いた。

(3) 抗体投与

マウス抗ヒトグリビカン 3 抗体 GC33 (後述の参考例を参照) を、投与当日、
20 生理食塩水 (大塚製薬) を用いて、0.5 mg/mL になるように調製し、投与試料とした。上記マウスモデルに対し、腫瘍移植後 21 日目と 28 日目に投与試料を 10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。陰性対照には生理食塩水を Vehicle として同様に投与した。

(4) 抗腫瘍効果の評価

25 抗腫瘍効果については腫瘍移植後 35 日目の AFP 濃度にて評価した。その結果、図 1 に示すとおり、GC33 投与群では Vehicle 投与群と比較して腫瘍移植後 35 日目において AFP 濃度の低下が認められ、本抗体による抗腫瘍効果が確認された。

以上より、GC33 が肝内移植モデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示され、本抗体のアジュvant療法への使用が可能であることが見出された。

実施例 2

肝内移植マウスモデルにおけるマウス抗ヒトグリビカン抗体 GC33 の早期投与試験

5 (1) α -フェトプロテイン(AFP)の測定

腫瘍マーカーとして、ヒト AFP 測定 ELISA キット (HOPE LABORATORIES 社製) を用い、血清中のヒト AFP 濃度を測定した。ELISA の測定限界は約 1 ng/mL であり、検出限界以下のサンプルについては 1 ng/mL とした。血清は眼窩採血により血液をセパラピット S (セキスイ化学) に採取し、室温で 15 分静置した後、

10 1200×g、20 分間遠心分離して得た。

(2) 肝内移植マウスモデルの作製

肝内移植マウスモデルは以下のように作製した。HepG2 細胞 (ATCC) をハンクス培地 (SIGMA 社製) で 1×10^8 個/mL になるように調製した。ネンブタールによる麻酔下で、ヌードマウス (チャールスリバー) の肝臓皮膜内へ HepG2 細胞懸濁液 50 μ L (5×10^6 個/マウス) を注入した。移植翌日の個体について無作為に 2 群に分けた (n=10)。移植翌日の時点ではマウス肝内に HepG2 が存在するが、マウス血清中にヒト AFP は検出されず、より臨床の肝切除後に残存する微小肝内転移に近いモデルとして用いた。

(3) 抗体投与

20 マウス抗ヒトグリビカン 3 抗体 GC33 を、投与当日、生理食塩水 (大塚製薬) を用いて、0.5 mg/mL になるように調製し、投与試料とした。上記マウスモデルに対し、腫瘍移植後翌日と 7 日目に投与試料を 10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。陰性対照には生理食塩水を Vehicle として同様に投与した。

(4) 抗腫瘍効果の評価

25 抗腫瘍効果については腫瘍移植後 15 日目と 40 日目の AFP 濃度にて評価した。その結果、図 2 に示すとおり、Vehicle 投与群では AFP 濃度の上昇が認められたのに対して、GC33 投与群では、いずれの測定時においても AFP 濃度の上昇が認められなかった。

以上より、肝臓がん細胞肝内移植モデルに対して、AFP が検出されない時期か

らマウス抗ヒトグリピカン3抗体GC33を投与することによっても、腫瘍増殖が抑制されることが示され、本抗体のアジュバント療法への使用可能性が示唆された。

5 参考例 マウス抗ヒトグリピカン3抗体 GC33 の作製

グリピカン3の524番目のAlaから563番目のLysまでのペプチドとGSTの融合タンパク質(GC-3)を免疫原として、Balb/c(日本チャールズリバーより購入)3匹、MRL/lpr3匹に対して免疫を行った。初回免疫にはGC-3を100 μ g/headとなるように調製し、FCAを用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2週間後に50 μ g/headとなるように調製したものをFIAでエマルジョン化したものを皮下に投与した。5回免疫の後、全マウスに対し最終免疫(50 μ g/head)を尾静脈内に行い細胞融合を行った。スクリーニングは、C末端側の疎水性領域(564-580アミノ酸)を欠損させた可溶型GPC3コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いたELISAにより行った。陽性クローンについては限界希釀法によりモノクローナル化した。その結果、GPC3に対して強い結合活性を有する抗体GC33を取得した。GC33のH鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号3に、L鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号4に示される。

産業上の利用性

20 本発明の抗癌剤は、癌の予防または再発予防に有用である。

請求の範囲

1. 癌治療後に投与されることを特徴とする、抗グリピカン3抗体を含有する抗癌剤。
- 5 2. 癌治療後が肝癌治療後である請求項1記載の抗癌剤。
3. 肝癌治療が肝癌細胞切除である請求項2記載の抗癌剤。
4. 切除された肝癌細胞にグリピカン3が発現している場合に使用されることを特徴とする、請求項2または3に記載の抗癌剤。
5. 抗体がモノクローナル抗体である請求項1－4のいずれかに記載の抗癌剤。
- 10 6. 癌治療後の患者に抗グリピカン3抗体を含有する抗癌剤を投与することにより癌の再発を予防する方法。
7. 癌治療後が肝癌治療後である請求項6記載の方法。
8. 肝癌治療が肝癌細胞切除である請求項7記載の方法。
9. 切除された肝癌細胞にグリピカン3が発現している、請求項7または8に記載の方法。
- 15 10. 抗体がモノクローナル抗体である請求項6－9のいずれかに記載の方法。

1/1

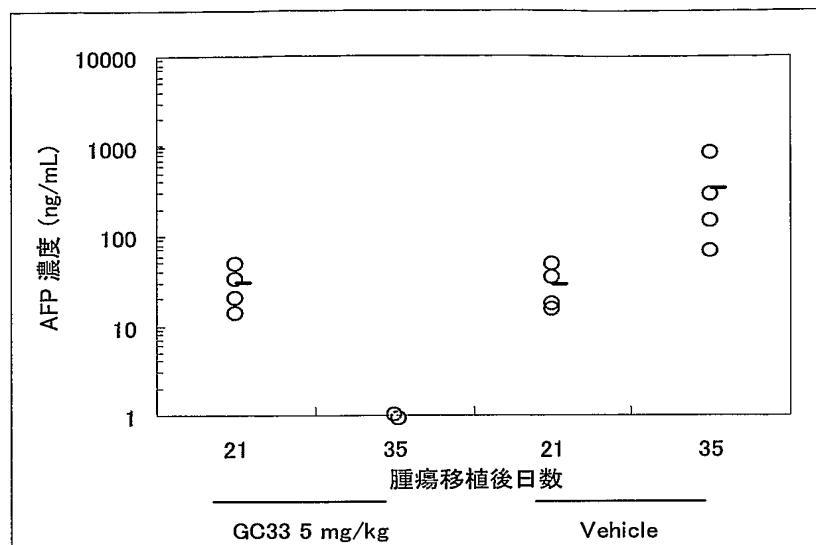


図1

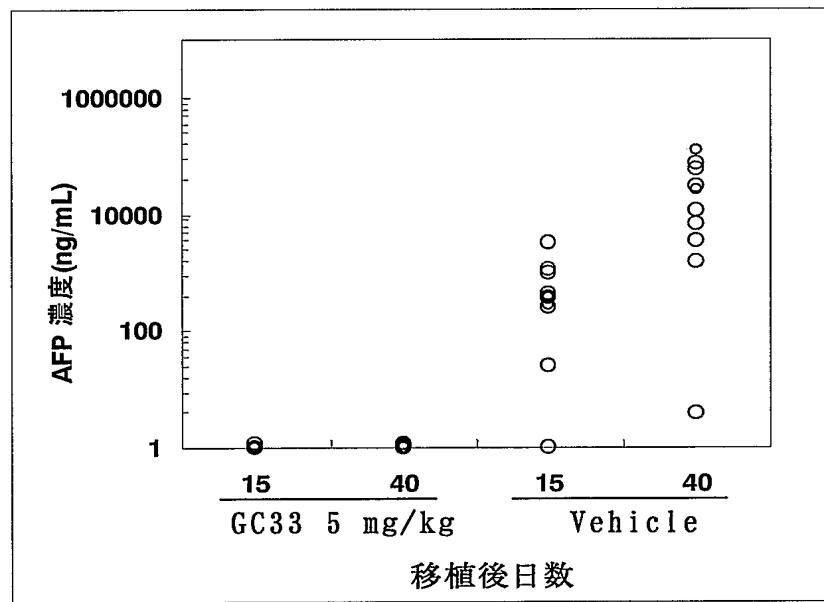


図2

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
<120> Adjuvant Therapy using Anti-Glypican 3 Antibodies
<130> PCG-9010WO
<150> JP 2005-90945
<151> 2005-03-28
<150> JP 2004-244273
<151> 2004-08-24
<160> 4
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 1743
<212> DNA
<213> homo sapiens
<400> 1
atggccggga ccgtgcgcac cgctgcttg gtgggtggcga tgctgctcag cttggacttc 60
ccggggacagg cgcagcccc gcccggccg ccggacgcca cctgtcacca agtccgctcc 120
ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccgt gccaggatca 180
gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240
taccaactaa cagcacgatt gaacatggaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300
aagttcttaa ttattcagaa tgctgcgtt ttccaagagg ccttgaaat tgttgttcgc 360
catgccaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagoct gactccacaa 420
gcttttgagt ttgtgggtga attttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgac 480
atcaatgttag atgacatggt caatgaattt tttgacagcc tgtttccagt catctataacc 540
cagctaatacg acccaggcct gcctgattca gccttggaca tcaatgagtg cctccgagga 600
gcaagacgtg acctgaaagt atttggaaat ttccccaagc ttattatgac ccaggtttcc 660
aagtcaactgc aagtcaactg gatcttcctt caggctctga atcttggaaat tgaagtgtac 720
aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgctcac cagaatgtgg 780
tactgctctt actgccaggg actgatgtatg gttaaaccct gtggcggtta ctgcaatgtg 840

gtcatgcaag gctgttatggc aggtgtggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt 900
 ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960
 cttggtctct tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaag 1020
 ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaata tagatctgct 1080
 tattatcctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca tgtagaacat 1140
 gaagaaaacct tatccagccg aagaaggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200
 ttctatagtg cttgcctgg ctacatctgc agccatagcc ctgtggcgga aaacgacacc 1260
 ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aaggaatgga 1320
 atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtggtcagt 1380
 caaattattg acaaactgaa gcacattaac cagctcctga gaaccatgtc tatgccccaaa 1440
 ggttagagttc tggataaaaaa cctggatgag gaagggtttg aaagtggaga ctgcggtgat 1500
 gatgaagatg agtgcattgg aggctctggt gatggaatga taaaagtgaa gaatcagctc 1560
 cgcttccttg cagaactggc ctatgatctg gatgtggatg atgcgcctgg aaacagtcag 1620
 caggcaactc cgaaggacaa cgagataagc acctttcaca acctcgggaa cgttcattcc 1680
 ccgctgaagc ttctcaccag catggccatc tcggtggtgt gcttcttctt cctgggcac 1740
 tga 1743

<210> 2

<211> 580

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45

Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60

Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys

65 70 75 80
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
85 90 95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
100 105 110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
115 120 125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
130 135 140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145 150 155 160
Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
165 170 175
Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
180 185 190
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
195 200 205
Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
210 215 220
Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
225 230 235 240
Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
245 250 255
Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
260 265 270
Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
275 280 285
Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
290 295 300
Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu

305 310 315 320
Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
325 330 335
Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
340 345 350
Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
355 360 365
Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
370 375 380
Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
385 390 395 400
Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
405 410 415
Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
420 425 430
Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
435 440 445
Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
450 455 460
Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
465 470 475 480
Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
485 490 495
Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
500 505 510
Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
515 520 525
Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
530 535 540
Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser

545

550

555

560

Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe

565

570

575

Phe Leu Val His

580

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015607

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁷ A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2003/883 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 January, 2003 (03.01.03), Claims & EP 141118 A1	1, 2, 5 3, 4
Y	Yoshiyuki YAMAGUCHI et al., "Gan Biotherapy no Kyo· Ashita", Biotherapy, 1999, Vol.13, No.7, pages 747 to 753	1-5
A	WO 2004/18667 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 04 March, 2004 (04.03.04), Full text (Family: none)	1-5

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 September, 2005 (13.09.05)	Date of mailing of the international search report 04 October, 2005 (04.10.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2005/015607

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUNG, Y.K. et al., Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma, Cancer Sci., 2003, Vol.94, No.3, pages 259 to 262	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2005/015607**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ A61K39/395, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl.⁷ A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922—1996年
日本国公開実用新案公報	1971—2005年
日本国実用新案登録公報	1996—2005年
日本国登録実用新案公報	1994—2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/883 A1 (中外製薬株式会社) 2003.01.03, 特許請求の範囲	1, 2, 5
Y	& EP 141118 A1	3, 4
Y	山口佳之 他, 癌バイオセラピィの今日・明日, Biotherapy, 1999, Vol.13, No.7, pp.747-753	1~5
A	WO 2004/18667 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2004.03.04, 全文 (ファミリーなし)	1~5

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.09.2005

国際調査報告の発送日

04.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

4C 3127

清野 千秋

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SUNG, Y. K. et al, Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma, Cancer Sci., 2003, Vol. 94, no. 3, pp. 259-262	1~5

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 6～10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 6～10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。